

Akt和Bad信号分子在人膝骨性关节炎中的变化*

陈青植¹, 余跃伟², 夏 春¹, 张 兵³

Variation of Akt and Bad in human knee osteoarthritis

Chen Qing-zhi¹, Yu Yue-wei², Xia Chun¹, Zhang Bing³

Abstract

BACKGROUND: Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB/Akt) signal pathway has been shown to promote cell proliferation and inhibit apoptosis. Application of PI3K/Akt signal pathway in osteoarthritis has aroused increasing attention, but its expression in human knee osteoarthritis cartilage tissue remains unclear.

OBJECTIVE: To investigate the changes of Akt, Bad pathway in knee osteoarthritis.

METHODS: The 31 samples of osteoarthritis human cartilage (experimental group) and 10 samples of normal human cartilage (control group) were selected. The normal histological technique and immunohistochemistry staining are used to detect the expression of Akt and Bad protein.

RESULTS AND CONCLUSION: ①The osteoarthritis cartilage became thinner, and the superficial layer becomes cracked; the chondrocytes in the intercellular and deep layer were disordered in the distribution. ②The expression of Akt protein in middle and deep layers of osteoarthritis human cartilage was significantly lower than normal human cartilage ($P < 0.01$), but the expression of Bad was similar between normal human cartilage and osteoarthritis human cartilage ($P > 0.01$). It is suggested that the PI3K/Akt pathway is closely related to the occurrence and development of the knee osteoarthritis. PI3K/Akt pathway changes may a major factor inducing articular cartilage damage. Bad dose not participate chondrocyte activities of osteoarthritis, but there is other substrate exists in PI3K/Akt pathway.

Chen QZ, Yu YW, Xia C, Zhang B. Variation of Akt and Bad in human knee osteoarthritis. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(33): 6175-6178. [<http://www.crter.cn> <http://en.zglckf.com>]

摘要

背景: 已知磷脂酰肌醇三磷酸激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB/Akt)信号途径具有促进细胞增殖、抑制凋亡的功能, 有关 PI3K/Akt 信号途径在骨性关节炎发病中的意义也引起关注, 但缺乏对 PI3K/Akt 信号途径在人膝骨性关节炎软骨组织中表达及意义的研究。

目的: 观察 Akt、Bad 信号分子在人膝骨性关节炎中的变化情况。

方法: 苏木精-伊红染色观察软骨组织形态学改变, 免疫组织化学技术检测 31 例膝骨性关节炎患者关节软骨(实验组)与 10 例正常人膝关节软骨(对照组)Akt 及 Bad 的分布和表达。

结果与结论: ①骨性关节炎关节软骨厚度变薄, 浅层破溃; 中层和深层软骨细胞排列紊乱、分布不均。②膝骨性关节炎患者中、深层软骨组织中 Akt 的表达均明显低于正常人关节软骨组织($P < 0.01$); Bad 在骨性关节炎患者及正常人关节软骨组织内均有表达, 但无显著性差异($P > 0.01$)。提示软骨细胞内 PI3K/Akt 信号途径与骨性关节炎的发生发展密切相关, PI3K/Akt 途径的变化可能是导致关节软骨破坏的主要因素之一。而 Bad 并没有参与骨性关节炎关节软骨细胞的生命活动, PI3K/Akt 途径调节另有其他底物存在。

关键词: 骨性关节炎; 软骨; Akt; Bad; 软骨组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.33.023

陈青植, 余跃伟, 夏春, 张兵. Akt 和 Bad 信号分子在人膝骨性关节炎中的变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(33):6175-6178. [<http://www.crter.org> <http://cn.zglckf.com>]

0 引言

骨性关节炎是关节软骨退行性改变性疾病, 临床特征为关节软骨裂变、糜烂、破坏及反应性骨质增生^[1-7]。文献表明软骨细胞凋亡是骨性关节炎病理改变的关键, 防止软骨细胞的过度凋亡已成为目前探讨预防和治疗骨性关节炎新途径的突破口^[8]。已知磷脂酰肌醇三磷酸激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, PKB/Akt)信号途径具有促进细胞增殖、抑制凋亡的功能^[9-10], 有关 PI3K/Akt信号途径在骨性关节炎发病中的意义

也引起关注, 但缺乏对PI3K/Akt信号途径在人膝骨性关节炎软骨组织中表达及意义的研究。本实验借助全膝关节置换取材, 苏木精-伊红染色观察软骨组织形态学改变, 免疫组织化学结合相关抗体观察, 并比较骨性关节炎患者膝关节软骨中Akt及Bad的表达与正常人膝关节软骨的区别, 从而了解Akt及Bad在膝骨性关节炎病程中的作用, 为探讨预防和治疗骨性关节炎新途径提供一定依据。

1 材料和方法

设计: 对比观察。

¹Department of Orthopedics, Teaching Hospital (Zhongshan Hospital of Xiamen University), Fujian Medical University, Xiamen 361004, Fujian Province, China; ²Department of Orthopedics, Xiamen Third Hospital, Xiamen 361100, Fujian Province, China; ³Xiamen University Medical School, Xiamen 361005, Fujian Province, China

Chen Qing-zhi★, Master, Department of Orthopedics, Teaching Hospital (Zhongshan Hospital of Xiamen University), Fujian Medical University, Xiamen 361004, Fujian Province, China
cqz3006@gmail.com

Correspondence to: Xia Chun, Department of Orthopedics, Teaching Hospital (Zhongshan Hospital of Xiamen University), Fujian Medical University, Xiamen 361004, Fujian Province, China
chunxia99@yahoo.com.cn

Received: 2010-02-02
Accepted: 2010-05-13

¹ 福建医科大学教学医院(厦门大学附属中山医院)骨科, 福建省厦门市 361004; ² 厦门市第三医院骨科, 福建省厦门市 361100; ³ 厦门大学医学院, 福建省厦门市 361005

陈青植★, 男, 1982年生, 福建省厦门市人, 汉族, 2010年福建医科大学毕业, 硕士, 主要从事关节软骨基础与临床的研究。
cqz3006@gmail.com

通讯作者: 夏春, 福建医科大学教学医院(厦门大学附属中山医院)骨科, 福建省厦门市 361004
chunxia99@yahoo.com.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)33-06175-04

收稿日期: 2010-02-02
修回日期: 2010-05-13
(20091202013/WL A)

时间及地点: 实验于2007-05/2009-06在厦门大学医学院病理学实验室和厦门大学附属中山医院中心实验室完成。

材料: 膝骨性关节炎患者行全膝关节置换后获膝骨性关节炎软骨组织标本31例, 男5例, 女26例; 年龄(62.3±8.8)岁。纳入标准: 严格按照美国风湿病学院(ACR)制定的骨性关节炎诊断标准, 骨性关节炎临床分期均为KL分级3级以上达到手术适应证者^[11-12]。排除标准: 通过临床一些指标数据排除有其他代谢性膝关节疾病。

外伤截肢或半月板损伤等患者行手术治疗获膝关节软骨组织10例, 男4例, 女6例; 年龄(58.0±11.5)岁, 经病理学诊断关节软骨无病变, 作为正常对照组。纳入标准: 年龄大于55岁。排除标准: 通过临床一些指标数据排除有其他代谢性膝关节疾病。

所有受试者对试验知情同意。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
兔抗人 Akt 和鼠抗人 Bad 单克隆抗体	Cell Signaling technology 公司
S-P 免疫及 DAB 显色试剂盒	福建福州迈新公司
LEICA DM2500 显微镜	厦门大学附属中山医院中心实验室

实验方法:

标本采集: 所有新鲜标本均以40 g/L多聚甲醛固定48 h, 15%EDTA 37℃脱钙2周。常规脱水, 石蜡包埋, 4 μm厚度连续切片。

苏木精-伊红染色检测骨性关节炎关节软骨组织形态学改变: 行常规苏木精-伊红染色脱蜡、染色过程。LEICA DM2500显微镜下观察正常软骨组织与骨性关节炎软骨组织以及软骨细胞排列、数量、大小、分布等变化并拍照。

免疫组织化学检测Akt和Bad蛋白分布及表达变化: 按SP试剂盒说明书进行, 分别结合Akt和Bad一抗(PBS代替一抗作为阴性对照)。经DAB显色, 苏木精复染后封固, LEICA DM2500显微镜下观察、拍照。

图像分析: Image-Pro Plus 6.0专业图像分析软件测定免疫组织化学切片的平均吸光度(average of optical density, AOD), 每张切片随机选取5个高倍视野(×400), 对视野中的阳性结果进行标记, 以AOD为参数。

主要观察指标: 免疫组织化学技术检测实验组与对照组Akt及Bad的分布和表达。

设计、实施、评估者: 实验设计为通讯作者, 干预实施为第一、二作者, 评估为通讯作者和第三作者, 经过正规培训, 采用盲法评估。

统计学分析: 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 由第一作者采用SPSS 13.0软件完成统计处理, 组间均数比较采用两样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 骨性关节炎软骨组织形态学改变

正常关节软骨:

浅层软骨细胞体积较小, 呈扁圆形, 单个分布, 排列密集, 其长轴平行于软骨表面; 中层软骨细胞呈圆形或椭圆形, 有“背靠背”现象; 深层软骨细胞较大, 形态不规则, 有多核细胞存在, 少数细胞群呈柱状排列, 垂直于软骨表面, 见图 1a。

骨性关节炎负重区关节软骨:

细胞数量明显减少。关节软骨表层破溃, 软骨厚度变薄; 中层和深层软骨细胞排列紊乱, 分布不均, 可见软骨细胞成团聚集, 出现大量的软骨空陷窝, 软骨细胞外基质明显减少, 见图 1b。

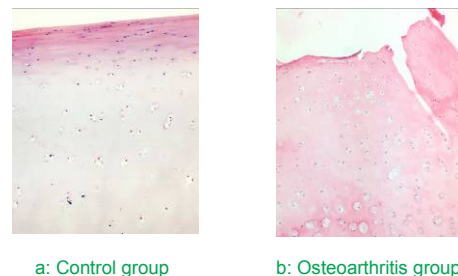
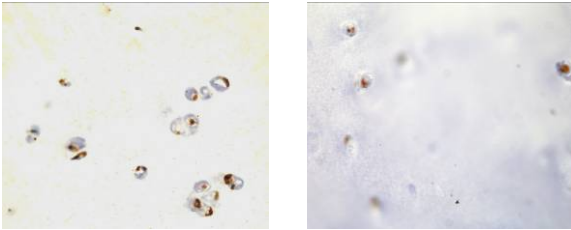


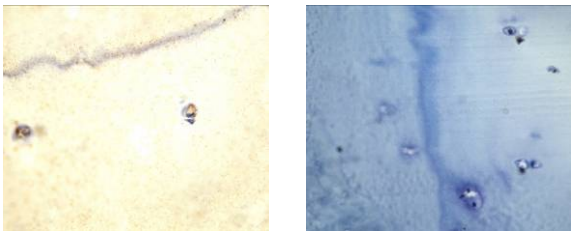
Figure 1 Hematoxylin-eosin staining of the morphous variation of osteoarthritis and normal cartilage (×100)
图 1 苏木精-伊红染色观察正常对照组及骨性关节炎软骨组织形态变化(×100)

2.2 正常和骨性关节炎软骨组织Akt及Bad表达 鉴于骨性关节炎状态下关节软骨浅层缺损明显, 实验主要比较正常与骨性关节炎负重区关节软骨的中层与深层Akt及Bad表达差异, 见图2~5, 图像分析并对其AOD值进行统计。结果显示: Akt在骨性关节炎负重区关节软骨的中层与深层表达均比正常低, 差异有显著性意义($P < 0.01$); 而Bad在正常和骨性关节炎负重区关节软骨组织中的表达差异无显著性意义($P > 0.01$), 见表1, 表2。



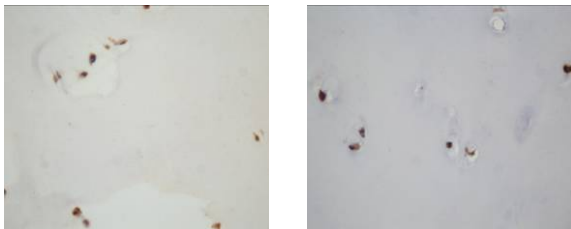
a: Weight loading region of normal joint

b: Weight loading region of osteoarthritis region

Figure 2 Expression of Akt in normal and osteoarthritis loading area cartilage transitional zone ($\times 400$)图2 正常关节负重区及骨性关节炎关节负重区软骨中层 Akt 表达($\times 400$)

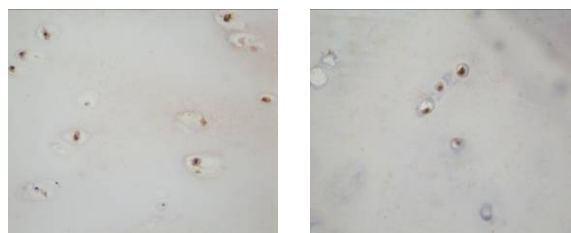
a: Weight loading region of normal joint

b: Weight loading region of osteoarthritis region

Figure 3 Expression of Akt in normal and osteoarthritis loading area cartilage radical zone($\times 400$)图3 正常关节负重区及骨性关节炎关节负重区软骨深层 Akt 表达($\times 400$)

a: Weight loading region of normal joint

b: Weight loading region of osteoarthritis region

Figure 4 Expression of Bad in normal and osteoarthritis loading area cartilage transitional zone ($\times 400$)图4 正常关节负重区及骨性关节炎关节负重区软骨中层 Bad 表达($\times 400$)

a: Weight loading region of normal joint

b: Weight loading region of osteoarthritis region

Figure 5 Expression of Bad in normal and osteoarthritis loading area cartilage radical zone($\times 400$)图5 正常关节负重区及骨性关节炎关节负重区软骨深层 Bad 表达($\times 400$)**表 1** 正常与骨性关节炎膝关节软骨中层内 Akt 和 Bad 的表达
Table 1 Expression of Akt and Bad in middle layer of normal and osteoarthritis cartilage transitional zone ($\bar{x} \pm s$)

Index	Control group	Osteoarthritis group	<i>t</i>	<i>P</i>
Akt	16.37 \pm 1.45	10.62 \pm 1.83	9.056	0.006
Bad	10.86 \pm 2.38	10.45 \pm 1.82	0.567	0.547

表 2 正常与骨性关节炎膝关节软骨深层内 Akt 和 Bad 的表达
Table 2 Expression of Akt and Bad in deep layer of normal and osteoarthritis cartilage radical zone ($\bar{x} \pm s$)

Index	Control group	Osteoarthritis group	<i>t</i>	<i>P</i>
Akt	14.24 \pm 2.47	9.03 \pm 3.37	2.768	0.009
Bad	10.09 \pm 2.44	10.34 \pm 1.80	-0.350	0.728

3 讨论

实验观察到人在骨性关节炎状态下膝关节软骨组织浅层出现明显的缺失, 中层和深层软骨细胞排列也紊乱; 软骨细胞数量明显减少, 这与以往学者研究结果是一致的^[13-15], 表明软骨细胞不规则排列和数量减少是骨性关节炎形态学变化的主要特征。

PKB/Akt是20世纪90年代发现的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。外界因子通过激活细胞内PI3K通路而磷酸化细胞膜上的磷脂酰肌醇4, 5-双磷酸(PtdIns(4, 5)P₂, PIP₂)的D3位点, 产生第二信使磷脂酰肌醇3, 4, 5-三磷酸(PtdIns(3, 4, 5)P₃, PIP₃)和磷脂酰肌醇3, 4-二磷酸(PtdIns(3, 4)P₂, PIP₂), 两者共同促使PKB的PH区域结合到细胞膜上, 在磷酸肌醇依赖性蛋白激酶(3-phosphoinositide-dependent protein kinase, PDK)和PDK-2作用下, PKB激酶活性区Loop内的苏氨酸(Thr308)和C-末端的丝氨酸(Ser473)被磷酸化, 从而激活Akt。活化的Akt最引人关注的功能之一是能够磷酸化Bad、caspase-9等一些凋亡前蛋白, 调节相关死亡基因, 进而抑制细胞凋亡、促进细胞存活^[9-10]。在肿瘤细胞中通过抑制PI3K/PKB通路, 就可以有效地抑制PKB, 从而诱导细胞凋亡^[16]。在软骨细胞中Oh等^[17]2003年就观察到兔关节软骨中PI3K、Akt等激酶参与调节了胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)抑制NO诱导的关节软骨细胞的去分化和凋亡活动。随后, 2007年有学者又发现在人关节软骨细胞中转化生长因子 β 通过PI3K/Akt途径磷酸化Akt进而诱导组织金属蛋白酶抑制因子3(tissue inhibitor of metalloproteinases-3, TIMP-3)基因表达, 从而增强软骨细胞外基质强度, 提高软骨细胞存活、维持关节完整性^[18]; Shakibaei等^[19]

又发现姜黄抑制了白细胞介素 1β 诱导的Akt的磷酸化作用, 进而阻止了NF- κ B进入细胞核, 抑制软骨细胞生长; 2008年Ulici等^[20]观察到抑制PI3K(抑制剂Ly294002)后可以减弱软骨细胞的生长, 同时伴有Akt磷酸化水平下降。这些结果明确显示外界因子能够通过作用PI3K/Akt信号通路, 改变Akt的磷酸化状态, 影响其下游底物, 从而调节软骨细胞的生长。本实验观察到人膝关节软骨组织中层和深层Akt表达伴随骨性关节炎有明显的减少, 而且主要集中于中层, Verschure等^[21]发现: 骨性关节炎早、中和晚期的软骨组织中层IGF-1受体的表达明显低于正常软骨组织中层IGF-1受体的表达。显示在骨性关节炎软骨组织中PI3K/Akt途径参与了软骨细胞的调节, 并且伴随骨性关节炎病程表达下降, 进而提示PI3K/Akt通路可作为临床上治疗骨性关节炎的靶点, 可通过提高Akt的表达而促进软骨细胞生长, 减少软骨细胞的凋亡。

PI3K/Akt作用众多靶分子, 例如促凋亡蛋白Bad、转录因子NF- κ B和caspase等, 调节细胞凋亡活动^[19-20]。实验结果显示促凋亡蛋白Bad在骨性关节炎患者及正常人关节软骨组织中分布未发生改变, 且在软骨细胞内的表达无显著性差异, 推测Akt可能并不是通过下游蛋白Bad发挥促软骨细胞凋亡作用, 提示可能通过其他下游蛋白如NF- κ B、caspase等途径促进软骨细胞凋亡^[22-23], 其确切降解机制尚需进一步深入研究。

总之, 实验通过与正常关节软骨组织比较, 观察骨性关节炎关节软骨组织浅层显著减少甚至缺如; 中层和深层软骨组织内Akt表达量减少, 差异具有显著性意义, 进而推测软骨细胞内PI3K/Akt信号途径与骨性关节炎的发生发展密切相关; 根据促凋亡蛋白Bad在骨性关节炎患者及正常人关节软骨组织中分布未发生改变, 提出PI3K/Akt途径调节另有其他底物存在, 为下一步研究提供参考。

4 参考文献

- [1] Martel-Pelletier J, Tardif G, Fernandes JC, et al. Metalloproteinases and their modulation as treatment in osteoarthritis. In: Tsokos GC, Ed. *Molecular Rheumatology*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. 2000:499-514.
- [2] Lark MW, Bayne EK, Flanagan J, et al. Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints. *J Clin Invest*. 1997;100(1):93-106.

- [3] Tortorella MD, Burn TC, Pratta MA, et al. Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins. *Science*. 1999;284(5420):1664-1666.
- [4] Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Howell DS. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Koopman WJ, Ed. *Arthritis & Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology*, 14th edn. Baltimore: Williams & Wilkins. 2000:2195-2245.
- [5] Massicotte F, Aubry I, Martel-Pelletier J, et al. Abnormal insulin-like growth factor 1 signaling in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(6):R177.
- [6] Héraud F, Héraud A, Harmand MF. Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Ann Rheum Dis*. 2000;59(12):959-965.
- [7] Kouril JB, Aguilera JM, Reyes J, et al. Apoptotic chondrocytes from osteoarthritic human articular cartilage and abnormal calcification of subchondral bone. *J Rheumatol*. 2000;27(4):1005-1019.
- [8] Kim HA, Blanco FJ. Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. *Curr Drug Targets*. 2007;8(2):333-345.
- [9] Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci*. 2001;26(11):657-664.
- [10] Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(7):489-501.
- [11] KELLGREN JH, LAWRENCE JS. Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1957;16(4):494-502.
- [12] Hart D, Spector T. Assessment of changes in joint tissues in patients treated with a disease-modifying osteoarthritis drug (DMOAD): monitoring outcomes. In: *Osteoarthritis*. Oxford, England: Oxford University Press. 1998:450-458.
- [13] Blanco FJ, Guitian R, Vázquez-Martul E, et al. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum*. 1998;41(2):284-289.
- [14] Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, et al. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 1998;41(9):1632-1638.
- [15] Grimmer C, Balbus N, Lang U, et al. Regulation of type II collagen synthesis during osteoarthritis by prolyl-4-hydroxylases: possible influence of low oxygen levels. *Am J Pathol*. 2006;169(2):491-502.
- [16] Zhang B, Wu Q. Xibao Shengwuxue Zazhi. 2002;24(4):209-212. 张兵, 吴乔. 蛋白激酶B的特性及其生物学功能[J]. 细胞生物学杂志, 2002;24(4):209-212.
- [17] Oh CD, Chun JS. Signaling mechanisms leading to the regulation of differentiation and apoptosis of articular chondrocytes by insulin-like growth factor-1. *J Biol Chem*. 2003;278(38):36563-36571.
- [18] Qureshi HY, Ahmad R, Sylvester J, et al. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway for regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 gene expression by TGF- β in human chondrocytes. *Cell Signal*. 2007;19(8):1643-1651.
- [19] Shakibaei M, John T, Schulze-Tanzil G, et al. Suppression of NF- κ B activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclo-oxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: Implications for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol*. 2007;73(9):1434-1445.
- [20] Ulici V, Hoenselaar KD, Gillespie JR, et al. The PI3K pathway regulates endochondral bone growth through control of hypertrophic chondrocyte differentiation. *BMC Dev Biol*. 2008;8:40.
- [21] Verschure PJ, Marle JV, Joosten LA, et al. Localization of insulin-like growth factor-1 receptor in human normal and osteoarthritic cartilage in relation to proteoglycan synthesis and content. *Br J Rheumatol*. 1996;35(11):1044-1055.
- [22] Wegener E, Krappmann D. Dynamic protein complexes regulate NF- κ B signaling. *Handb Exp Pharmacol*. 2008;(186):237-259.
- [23] Sugimori K, Matsui K, Motomura H, et al. BMP-2 prevents apoptosis of the N1511 chondrocytic cell line through PI3K/Akt-mediated NF- κ B activation. *J Bone Miner Metab*. 2005;23(6):411-419.